

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

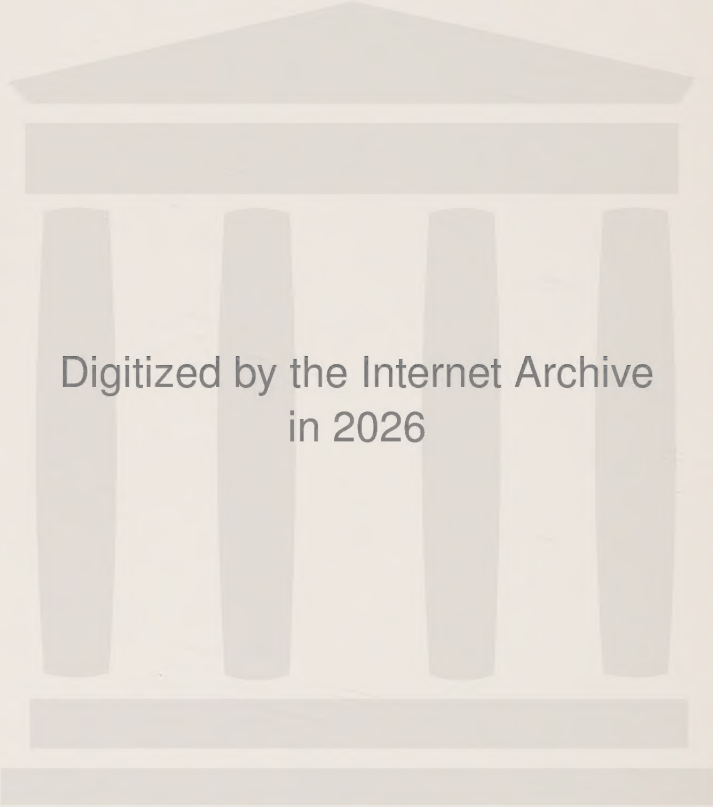
Die Hemmung der menschlichen Serumparaoxonase durch EDTA

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Renate Hechtel
aus Selb/Ofr.

1980

1981 # 156



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546215_0069

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Die Hemmung der menschlichen Serumparaoxonase durch EDTA

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Renate Hechtel
aus Selb/Ofr.



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 11. 1980

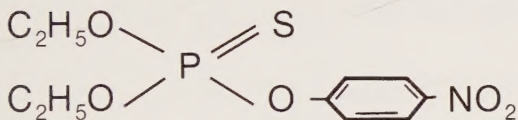
INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	5
II. Problemstellung	10
III. Eigene Untersuchungen	14
1. Methodik	14
2. Präzision	20
3. Messung der Aktivität nach Krisch unter Zusatz von EDTA	21
4. Versuch einer Aufhebung der EDTA- Hemmung durch Ca^{2+} -Zusatz	30
5. Versuch eines Schutzes des Enzyms vor der EDTA-Hemmung durch Ca^{2+} -Zusatz	32
IV. Diskussion	35
V. Zusammenfassung	41
VI. Literaturverzeichnis	43

Die Alkylphosphate, zu denen Nitrostigmin = Parathion = E 605 = O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat (Abb. 1) zählt, haben als Cholinesterasehemmer in der medizinischen Therapie eine geringe Bedeutung. Sie dienen hauptsächlich als Schädlingsbekämpfungsmittel, wobei es nach unsachgemäßer Benutzung zu schweren Vergiftungen kommen kann. Sowohl bei Inhalation (nach Versprühung) als auch nach Ingestion (akzidentiell, suicidal, Mord) als auch nach Benetzung der Haut (Unfälle) erfolgt die Resorption sehr schnell. Die gute Fett- und Lipidlöslichkeit ist eine wichtige Voraussetzung für ihre starke Wirkung.

Abbildung 1:

E 605 = Parathion = Nitrostigmin = O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat



Wichtig ist, daß eine Zunahme der Toxizität als Folge metabolischer Prozesse eintritt. So wird die kaum wirksame --P=S-- Verbindung Parathion in die giftigere --P=O-- Verbindung Paraoxon = E 600 umgewandelt.

Der Wirkungsmechanismus beruht auf einem starken Elektronenmangel des Phosphoratoms der Alkylphosphate, weil es einen entsprechenden Substituenten wie bei E 600 die p-Nitrophenylgruppe trägt. Die Cholinesterase enthält die Aminosäure-Folge --Glu--Ser--Ala-- und ist damit ein sogenanntes Serinenzym: der Sauerstoff der OH-Gruppe im Serin ist elektronenreich. Bei der Reaktion von E 600 mit Cholinesterase bildet sich somit rasch und weitgehend irreversibel ein Alkylphosphat-Enzymkomplex, der durch Abspaltung von Alkylresten eine „Alterung“ zur Folge hat, wodurch Cholinesterase-reaktivatoren oft kaum noch wirksam werden können.

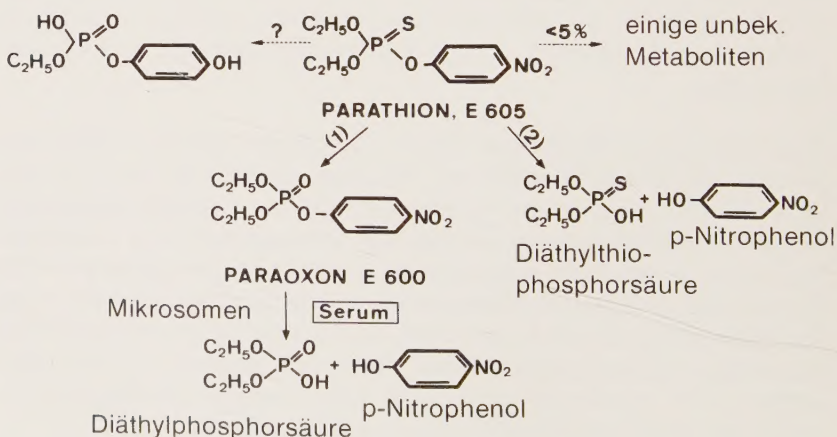
Die gehemmte Cholinesterase ist somit nicht imstande den Überträgerstoff Acetylcholin zu spalten. Dadurch ergibt sich eine Anhäufung dieses Stoffes an den autonomen und zentralen Synapsen, sowie an der motorischen Endplatte und an den postganglionären parasympathischen Nerven.

Klinisch haben wir ein muskarin- und nikotinähnliches Vergiftungsbild. Wir sprechen von einer endogenen Acetylcholinvergiftung. Die klinischen Erscheinungen treten im allgemeinen erst auf, wenn die Serumcholinesterase um etwa 75% gehemmt ist. Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität gibt somit ein gutes Maß für den Grad der Vergiftung oder der Exposition an und dient zudem der Verlaufskontrolle einer Alkylphosphatvergiftung in der Klinik.

Der Stoffwechsel des E 605 ist bei Warmblüter und Mensch gut untersucht (**Neal 1971**, **Poore und Neal 1972**). Die bis heute bekannten Umsetzungen sind in der folgenden Abb. 2 wiedergegeben.

Abbildung 2:

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



Schon **Aldrige** (1953) (weitere Literatur bei **Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeitern** 1973b) konnte aber zeigen, daß auch das Serum vieler Warmblüter ein Enzym enthält, das in der Lage ist, Paraoxon hydrolytisch zu spalten. In der gültigen Enzymnomenklatur (1972) findet sich hierfür als nicht empfohlene Bezeichnung der Name „Paraoxonase“. Empfohlen wird die Bezeichnung Arylester-Hydrolase, Arylesterase E.C.3.1.1.2. Als wesentliche Reaktion wird diesem Enzym die Spaltung von Phenylacetat in Phenol und Essigsäure zugeschrieben. Zur Spezifität wird festgestellt, daß dieses Enzym zahlreiche Ester des Phenols spaltet, das Enzym aus Schafserum auch Paraoxon.

Die Paraoxonase ist ein auch im menschlichen Serum vorkommendes Enzym.

Krisch (1968) konnte in einer Arbeit über die enzymatische Hydrolyse von E 600 durch menschliches Serum die E 600 – Esterase folgendermaßen charakterisieren:

Michaeliskonstante (K_M) zwischen $2,5$ und $5,7 \times 10^{-4}$

Einfluß von Inhibitoren:

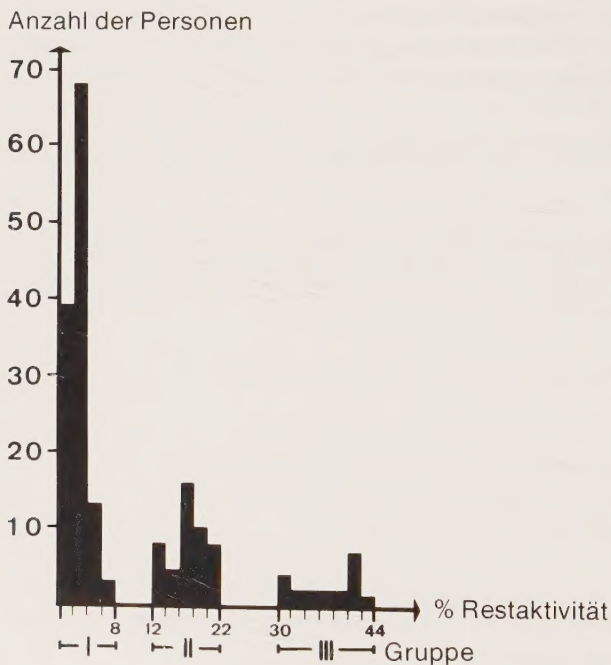
- a) typische B-Esterase-Inhibitoren blieben ohne Wirkung
- b) Hemmbarkeit durch Chelatbildner, insbesondere EDTA
- c) pH-Optimum zwischen 11,0 und 11,6

Ferner stellte er in einem einfachen photometrischen Verfahren fest, daß im pH-Optimum ($\text{pH} = 11,2$) Personen mit unterschiedlicher Enzymaktivität zu finden waren.

Während mit dem Verfahren von **Krisch** (1968) über die p-Nitrophenolabspaltung eine sichere Zuordnung jedes Serums nicht möglich ist, da zwischen den einzelnen Gruppen offenbar ein relativ breiter Überlappungsbereich besteht, war es mit der Anti-ChE-Technik in der Warburgapparatur zunächst möglich, drei gut getrennte Gruppen darzustellen, und jedes Serum eindeutig zuzuordnen (**Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeiter** 1973b). Die Verteilung ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Abbildung 3:

Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase gemessen mit der Anti-ChE-Technik (**Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeiter** 1973b)



Die Autoren überprüften mit dieser Technik die Verteilung der drei Paraoxonase-Gruppen in der Bevölkerung. Danach baut etwa 60% E 600 im Serum relativ langsam ab, während 34% mit mittlerer, 6% mit hoher Geschwindigkeit hydrolysiert (**Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeiter** 1969a, **Dumbach** 1976).

Familienuntersuchungen an 100 Familien mit 180 Kindern wiesen darauf hin, daß dieser Polymorphismus genetisch bedingt ist, und möglicherweise einem intermediären, nicht geschlechtsgebundenen Erbgang folgt (**Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeiter** 1973a, **Dumbach** 1976).

Daraus geht hervor, daß es besonders gefährdete Personen gibt und zu einem geringeren Maße solche, die Paraoxon schneller abbauen können. Gefährdet ist jedoch jeder der mit Schädlingsbekämpfungsmitteln beruflich oder auch privat zu tun hat. Es ist deshalb wichtig, sich sorgfältig beim Umgang mit Alkylphosphaten zu schützen.

Schon **Krisch** (1968) hat festgestellt, daß Ca^{2+} für die Aktivität der menschlichen Serumpaeroxonase nötig ist. Er konnte eine Aktivitätssteigerung durch Ca^{2+} von etwa 40% zeigen.

Hartl (1978) konnte eine Aktivierbarkeit der Peroxonase durch Ca^{2+} um etwa 40% nur zum Teil bestätigen. Lediglich die Peroxonaseaktivität des niedrigen Typs konnte durch Zusatz von Ca^{2+} um etwa 42,5% gesteigert werden. Das Aktivitätsoptimum wurde bei $1,5 \times 10^{-2} \text{ M Ca}^{2+}$ /Meßansatz erreicht. Weiterer Ca^{2+} -Zusatz ergab weder eine Steigerung noch eine Abnahme der Aktivität.

Das Aktivitätsoptimum des mittleren Typs wurde schon durch den Zusatz von $8,6 \times 10^{-3} \text{ M Ca}^{2+}$ /Meßansatz erreicht. Die Steigerungsrate bezüglich der Ausgangsaktivität betrug bis zu 8,8%. Beim Überschreiten der, für diese Gruppe, optimalen Ca^{2+} -Konzentration wurde die Peroxonaseaktivität deutlich gehemmt; parallel zur zunehmenden Ca^{2+} -Konzentration fiel die Aktivität ab, bis schließlich bei einer Konzentration von $7,2 \times 10^{-2} \text{ M Ca}^{2+}$ /Meßansatz ein Aktivitätsverlust von 17,6%, gemessen zum Aktivitätsoptimum auftrat.

Die Peroxonaseaktivität des hohen Typs war durch Ca^{2+} überhaupt nicht zu steigern. Das Aktivitätsoptimum war identisch mit der Ausgangsaktivität. Durch steigenden Ca^{2+} -Zusatz zum Meßansatz wurde die Peroxonaseaktivität kontinuierlich gehemmt; bei $1,8 \times 10^{-7} \text{ M Ca}^{2+}$ /Meßansatz wurden nur noch 64,5% der Ausgangsaktivität erreicht.

Diese Ergebnisse bestätigen die früheren Arbeiten von **Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeiter** (1968) über die trimodale Aktivitätsverteilung der Peroxon-Spaltung im Serum.

Krisch (1968) fand auch gewisse Inhibitoren, die er in folgender Tabelle 1 darstellte:

Tabelle 1:

Einfluß einiger Inhibitoren auf die enzymatische Spaltung von E 600 durch Serum nach **Krisch** (1968)

Inhibitor	Endkonzentration (M)	Aktivität in % der Ausgangsaktivität	± s
Diisopropylfluorophosphat	10^{-4}	85	6,1
	10^{-5}	92	2,9
Physostigmin	10^{-3}	92	3,7
	10^{-4}	93	3,3
Chinin-HCl	10^{-3}	51	10,9
	10^{-4}	96	3,4
Atoxyl	10^{-3}	95	3,6
	10^{-4}	100	1,0
Natriumfluorid	10^{-3}	102	10,3
	10^{-4}	97	6,7
p-Chloromercuribenzoat	10^{-4}	59	24,9
	10^{-5}	90	3,4
Bathocupreindisulfonsäure	10^{-3}	60	14,9
	10^{-4}	78	9,4
o-Phenanthrolin	10^{-3}	88	4,1
	10^{-4}	94	3,6
8-Hydroxychinolin	10^{-3}	62	9,4
	10^{-4}	68	10,4
EDTA	10^{-3}	45	13,6
	10^{-4}	53	15,6

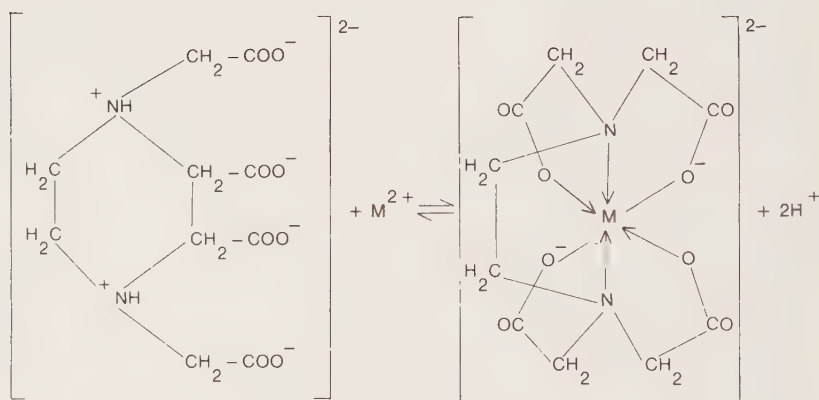
Krisch (1968) hebt dabei besonders die Empfindlichkeit der Serum-paraoxonase gegen Chelatbildner hervor, insbesondere gegen EDTA.

Diese Hemmbarkeit durch EDTA ließ an eine Abhängigkeit der Serum-esterase von Ca^{2+} denken, wobei bei Zugabe von EDTA letzteres als Ca^{2+} -Fänger fungiert.

EDTA bildet nämlich in alkalischer Lösung (im photometrischen Verfahren nach **Krisch** wird bei $\text{pH} = 11,2$ gearbeitet) mit zweifach positiv geladenen Kationen einen 1:1 Komplex, wobei 2H^+ -Ionen frei werden (**Jander, Blasius 1973**), wie Abb. 4 zeigt.

Abbildung 4:

Schematische Darstellung der Bildung eines EDTA-Komplexes



EDTA = Äthylendinitrilotetraessigsäure = $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$
 MG = 292,25

Über eine solche Hemmung eines Enzyms, das wohl mit der Paraoxonase identisch ist, berichteten schon **Marton und Kalow** (1960), wobei EDTA in einer Konzentration von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ die Aktivität der A-Esterase vollständig blockiert. Die durch EDTA blockierte Aktivität konnte durch Zufuhr von verschiedenen zweiwertigen Metallionen

wiederhergestellt werden. Auch **Erdös, Debay** und **Westermann** (1959) beobachteten, daß nach Zufuhr von EDTA zu Blutproben zwecks Verhütung der Blutgerinnung, die Arylesterase gehemmt wird, ohne dabei die Cholinesterase zu beeinträchtigen.

Choi und **Forster** (1967a) und **Erdös, Debay** und **Westermann** (1960) stimmen überein, daß niedrige Konzentrationen von EDTA-Lösungen sich günstig auf die Arylesterase-Aktivität auswirken. Höhere Konzentrationen (10^{-4} Mol und mehr) aber bilden mit Calciumionen Komplexe und hemmen die Arylesterase-Aktivität (**Erdös, Debay** und **Westermann** 1960). Analoge Beobachtungen machten **Erdös** und **Boggs** (1961) für die Hydrolyse von Paraoxon, dessen enzymatische Hydrolyse in den Seren von Schwein, Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen und Schaf teilweise oder vollständig durch EDTA blockiert wurde.

Menzel (1978) hebt zahlreiche weitere Substanzen hervor, die die Aktivität der Arylesterase hemmen.

Zu jenen gehören:

Jodacetamid, o-Jodobenzoat, p-Chlormercuribenzoessäure, p-Chlormercuriphenylsulfonsäure, Schwermetallionen, Na-Ionen in hoher Konzentration, Harnstoff, Guanidinhydrochlorid, Versen, Methanol, Glykolmonomethyläther, Aceton, Schwefelverbindungen, Phosphorsäureester, Aldrin und einige Medikamente.

Die stärksten Hemmer der Arylesteraseaktivität sind einige seltene Erden, die jedoch nicht alle Arylesterasen in gleichem Ausmaß hemmen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, in wie weit EDTA in verschiedenen Konzentrationen einen Einfluß auf die Aktivität der menschlichen Serumpaeroxonase im Bestimmungsansatz nach **Krisch** hat. Weiter war zu prüfen, ob unter Umständen durch eine unterschiedliche Hemmung der drei Paraoxonasetypen eine qualitative Differenzierung derselben in einfacher Weise möglich ist. Dabei erfolgte die Typenfestlegung nach **Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeitern** (1973a).

1. METHODIK

Zur Bestimmung der Aktivität der Paraoxonase von menschlichem Serum wurde der photometrische Test nach **K. Krisch** (1968) angewandt, welcher die Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon (E 600) mißt. Die enzymatische Hydrolyse wurde in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration des Glycinpuffers bestimmt. Der Puffer enthielt kein Äthylenglykol, weil dieser selbst ein Hemmstoff für die Serumparaoxonase ist.

a) Reagenzien

- 1.) 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer, pH = 11,2 mit unterschiedlicher EDTA-Konzentration von 1×10^{-7} – 1×10^{-3} M EDTA
- 2.) E 600 Stammlösung ($1,2 \times 10^{-2}$ M E 600 in 0,1 M Tris-Puffer, pH = 8)
- 3.) E 600 Gebrauchslösung
- 4.) 0,9%-ige NaCl-Lösung
- 5.) verdünntes Serum

b) Herstellung der Lösungen

Glycin-NaOH-Puffer

7,507 g Glycin ad 900 ml aqua dest. mit 35% NaOH einstellen auf pH = 11,2 mittels pH-Meter.

Auffüllen des Puffers auf 1000 ml.

Tris-Puffer

12,114 g Tris ad 900 ml aqua dest. mit 0,1 n HCl einstellen auf pH = 8,0 mittels pH-Meter.

Auffüllen des Puffers auf 1000 ml.

E 600 Stammlösung

0,26 ml E 600 ad 100 ml Tris-Puffer, einige Minuten im Schliffkolben kräftig schütteln.

E 600 Gebrauchslösung

Verdünnung der Stammlösung 1:5 mit aqua dest..

Serumverdünnung

Serum 1:5 mit 0,9%-iger NaCl verdünnt.

c) Aufstellung der Konzentrationsreihe für EDTA

Es wurde 29,2 mg EDTA in 100 ml Glycinpuffer pH = 11,2 eingewogen. Die EDTA-Konzentration betrug danach 1×10^{-3} m; bzw. wurde 14,6 mg EDTA in 100 ml Glycinpuffer pH = 11,2 eingewogen. Die EDTA-Konzentration betrug danach 5×10^{-4} m.

Durch Verdünnung dieser beiden Stammlösungen wurde eine Konzentrationsreihe für EDTA erstellt.

Für die EDTA-Konzentration im Meßansatz errechneten sich folgende in Tabelle 2 dargestellten Werte.

$$\text{Der Verdünnungsfaktor } f = \frac{3,3}{4,8} = 0,69$$

Daraus folgt:

$$1 \times 10^{-3} \times 0,69 = 6,9 \times 10^{-4} \text{ Mol/l im Meßansatz, bzw.}$$

$$5 \times 10^{-4} \times 0,69 = 3,45 \times 10^{-4} \text{ Mol/l im Meßansatz}$$

Tabelle 2:

EDTA-Konzentrationen in Mol/l im Meßansatz

$$6,9 \times 10^{-8}$$

$$3,45 \times 10^{-7}$$

$$6,9 \times 10^{-7}$$

$$3,45 \times 10^{-6}$$

$$6,9 \times 10^{-6}$$

$$3,45 \times 10^{-5}$$

$$6,9 \times 10^{-5}$$

$$3,45 \times 10^{-4}$$

$$6,9 \times 10^{-4}$$

Der pH-Wert des Puffers blieb dabei unverändert bei $\text{pH} = 11,2$. Alle Lösungen hatten vor der Messung eine Temperatur von 25°C .

d) Meßansatz

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer bzw. Glycin-NaOH-Puffer mit EDTA

0,5 ml Serumverdünnung

1,0 ml E 600 Gebrauchslösung

Nach dem Durchmischen wurde ein Teil des Reagenzglasinhalts in eine 1 cm-Küvette gegeben.

Pro Konzentration wurde dreimal ein Ansatz gemessen.

e) Messung

30 Sekunden und 180 Sekunden nach Starten der Reaktion durch die Zugabe von E 600, wurde bei der Wellenlänge 405 nm, Temperatur 25°C , die Extinktion des durch Hydrolyse freigesetzten p-Nitrophenol abgelesen. Die Probe wurde gegen den unter gleichen Bedingungen gemessenen Leerwert (mit 0,9%-iger NaCl-Lösung statt Serum) gemessen. Ausgerechnet wurde die Extinktionsdifferenz 180 Sekunden minus 30 Sekunden.

Eine Inkubation des Serums schon mit Glycin-NaOH-Puffer allein, bzw. Glycin-NaOH-Puffer mit EDTA für $\frac{1}{2}$ Stunde bzw. 1 Stunde ergab vom eigentlichen Meßwert stark abweichende, niedrigere Meßwerte, wie Tabelle 3 zeigt. Man hatte dabei den Eindruck, daß das Enzym bei der Inkubation teilweise inaktiviert wurde. Deshalb wurde bei den Tests auf eine Inkubation mit dem Hemmstoff verzichtet.

Die Zuordnung der Seren erfolgte dabei entsprechend **Geldmacher-v. Mallinckrodt** und **Mitarbeiter** (1973 a):

niedriger Typ 30 – 190 U/l
mittlerer Typ 190 – 350 U/l
hoher Typ > 350 U/l

Tabelle 3:

Einfluß der Inkubation des Serums mit Glycin-NaOH-Puffer bzw. Glycin-NaOH-Puffer mit EDTA

a) niedriger Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz mol/l	Enzymaktivität U/l		
	ohne Inkubation	nach ½ Std. Inkubation	nach 1 Std. Inkubation

Merklein, Bernhard, 42 J.

	Aktivität	108,1	89,9	67,0
$6,9 \times 10^{-8}$		103,4	74,4	70,2
$3,45 \times 10^{-7}$		101,3	73,4	72,8
$6,9 \times 10^{-7}$		104,1	71,2	68,6
$3,45 \times 10^{-6}$		102,8	63,3	68,1
$6,9 \times 10^{-6}$		102,8	65,4	70,2
$3,45 \times 10^{-5}$		87,5	59,0	57,4
$6,9 \times 10^{-5}$		53,5	46,8	47,3
$3,45 \times 10^{-4}$		38,3	27,1	31,9
$6,9 \times 10^{-4}$		38,3	34,0	42,5

b) mittlerer Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	ohne Inkubation	Enzymaktivität U/l nach ½ Std. Inkubation	nach 1 Std. Inkubation
---	--------------------	---	---------------------------

Hechtel, Renate, 27 J.

	Aktivität	258,3	98,3	124,9
$6,9 \times 10^{-8}$		271,1	92,5	118,0
$3,45 \times 10^{-7}$		250,9	82,4	92,5
$6,9 \times 10^{-7}$		248,7	80,8	75,0
$3,45 \times 10^{-6}$		253,7	86,1	66,0
$6,9 \times 10^{-6}$		246,9	70,7	77,1
$3,45 \times 10^{-5}$		192,8	56,9	56,4
$6,9 \times 10^{-5}$		50,3	40,9	40,4
$3,45 \times 10^{-4}$		40,9	30,3	25,5
$6,9 \times 10^{-4}$		40,8	33,5	33,0

c) hoher Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	ohne Inkubation	Enzymaktivität U/l nach ½ Std. Inkubation	nach 1 Std. Inkubation
---	--------------------	---	---------------------------

Geldmacher, Herbert, 62 J.

	Aktivität	428,7	145,1	74,9
$6,9 \times 10^{-8}$		413,9	138,2	72,8
$3,45 \times 10^{-7}$		410,3	135,6	82,4
$6,9 \times 10^{-7}$		434,4	110,3	71,3
$3,45 \times 10^{-6}$		404,0	69,1	61,1
$6,9 \times 10^{-6}$		394,0	65,4	60,1
$3,45 \times 10^{-5}$		318,9	36,2	59,6
$6,9 \times 10^{-5}$		30,1	24,0	21,8
$3,45 \times 10^{-4}$		23,7	15,4	14,4
$6,9 \times 10^{-4}$		23,7	17,5	19,2

f) Berechnung

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_{180} - E_{30}$ in nmol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycinpuffer pH = 11,2) bei 405 nm = $18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ zugrunde gelegt. 10 nmol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung, der Meßzeit und des Ansatzvolumens errechnet sich die Aktivität nach der Formel:

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= \frac{\Delta E \times 10 \times 4,8 \times 10}{0,1805 \times 2,5} \\ &= \Delta E \times 1063 \text{ (U/l Serum)} \end{aligned}$$

2. PRÄZISION

Zur Ermittlung der Präzision wurde für ein Serum mit einer Paraoxonase-Aktivität von 301,0 U/l zwölf Mal die Aktivität bestimmt, und dann die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4:

Ermittlung der Präzision für die Messung der enzymatischen Spaltung von E 600 durch Serum

Extinktion		ΔE	Aktivität U/l
30 s	180 s		
0,04	0,318	0,278	295,5
0,04	0,323	0,283	301,0
0,06	0,338	0,278	295,5
0,055	0,335	0,280	297,6
0,04	0,324	0,284	301,9
0,03	0,316	0,286	304,18
0,06	0,35	0,290	308,3
0,04	0,328	0,288	304,1
0,02	0,304	0,284	301,9
0,05	0,336	0,286	304,0
0,055	0,335	0,280	297,6
0,06	0,343	0,283	300,8

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = 301,0 \text{ U/l}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 3,73$$

$$VK = 1,24\%$$

3. MESSUNG DER AKTIVITÄT NACH KRISCH UNTER ZUSATZ VON EDTA

Die Messungen der Paraoxonase-Aktivität bei den verschiedenen EDTA-Konzentrationen wurden mit 15 verschiedenen Seren, deren Zuordnung entsprechend Seite 17 erfolgte, durchgeführt, und zwar mit:

5 vom niedrigen Typ

5 vom mittleren Typ

5 vom hohen Typ

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5:

Einfluß von EDTA auf die Messung der Paraoxonase-Aktivität nach **Krisch** (1968)

a) niedriger Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
1. Merklein, Bernhard, 42 J.		
	Aktivität 108,1	
$6,9 \times 10^{-8}$	103,4	95,7
$3,45 \times 10^{-7}$	101,3	93,7
$6,9 \times 10^{-7}$	104,1	96,3
$3,45 \times 10^{-6}$	102,8	95,1
$6,9 \times 10^{-6}$	102,8	95,1
$3,45 \times 10^{-5}$	87,5	80,9
$6,9 \times 10^{-5}$	53,5	49,5
$3,45 \times 10^{-4}$	38,3	35,4
$6,9 \times 10^{-4}$	38,3	35,4

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

2. Opitz, Otto, 56 J.

Aktivität 106,3

$6,9 \times 10^{-8}$	105,2	98,9
$3,45 \times 10^{-7}$	103,8	97,6
$6,9 \times 10^{-7}$	104,5	98,3
$3,45 \times 10^{-6}$	105,6	99,3
$6,9 \times 10^{-6}$	105,5	99,3
$3,45 \times 10^{-5}$	89,7	84,4
$6,9 \times 10^{-5}$	52,4	49,3
$3,45 \times 10^{-4}$	42,2	39,7
$6,9 \times 10^{-4}$	41,8	39,3

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

3. Seil van, Joachim, 30 J.

Aktivität 102,4

$6,9 \times 10^{-8}$	100,6	98,2
$3,45 \times 10^{-7}$	97,8	95,5
$6,9 \times 10^{-7}$	99,2	96,9
$3,45 \times 10^{-6}$	97,1	94,8
$6,9 \times 10^{-6}$	95,7	93,5
$3,45 \times 10^{-5}$	75,8	74,0
$6,9 \times 10^{-5}$	48,9	47,8
$3,45 \times 10^{-4}$	37,6	36,7
$6,9 \times 10^{-4}$	37,6	36,7

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

4. Götz, Harald, 29 J.

Aktivität 95,3

$6,9 \times 10^{-8}$	93,2	97,8
$3,45 \times 10^{-7}$	92,8	97,4
$6,9 \times 10^{-7}$	93,9	98,5
$3,45 \times 10^{-6}$	93,9	98,5
$6,9 \times 10^{-6}$	93,9	98,5
$3,45 \times 10^{-5}$	80,1	84,1
$6,9 \times 10^{-5}$	51,8	54,3
$3,45 \times 10^{-4}$	47,5	49,8
$6,9 \times 10^{-4}$	46,8	49,1

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

5. Geldmacher, Marika, 55 J.

Aktivität 92,8

$6,9 \times 10^{-8}$	91,8	98,9
$3,45 \times 10^{-7}$	90,0	97,0
$6,9 \times 10^{-7}$	91,4	98,5
$3,45 \times 10^{-6}$	91,4	98,5
$6,9 \times 10^{-6}$	91,4	98,5
$3,45 \times 10^{-5}$	81,5	87,8
$6,9 \times 10^{-5}$	44,6	48,1
$3,45 \times 10^{-4}$	42,2	45,5
$6,9 \times 10^{-4}$	41,5	44,7

b) mittlerer Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

1. Kimonyo, Jeannie, 29 J.

Aktivität 298,5

$6,9 \times 10^{-8}$	311,5	104,4
$3,45 \times 10^{-7}$	294,1	98,5
$6,9 \times 10^{-7}$	281,7	94,4
$3,45 \times 10^{-6}$	298,0	99,8
$6,9 \times 10^{-6}$	290,2	97,2
$3,45 \times 10^{-5}$	180,4	60,4
$6,9 \times 10^{-5}$	46,8	15,7
$3,45 \times 10^{-4}$	43,2	14,5
$6,9 \times 10^{-4}$	42,9	14,4

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

2. Machbert, Günther, 42 J.

Aktivität 275,7

$6,9 \times 10^{-8}$	265,4	96,3
$3,45 \times 10^{-7}$	265,4	96,3
$6,9 \times 10^{-7}$	265,4	96,3
$3,45 \times 10^{-6}$	273,2	99,1
$6,9 \times 10^{-6}$	265,8	96,4
$3,45 \times 10^{-5}$	187,8	68,1
$6,9 \times 10^{-5}$	40,4	14,7
$3,45 \times 10^{-4}$	36,5	13,2
$6,9 \times 10^{-4}$	33,0	12,0

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

3. Hechtel, Renate, 27 J.

Aktivität 258,3

$6,9 \times 10^{-8}$	271,1	105,0
$3,45 \times 10^{-7}$	250,9	97,1
$6,9 \times 10^{-7}$	248,7	96,3
$3,45 \times 10^{-6}$	253,7	98,2
$6,9 \times 10^{-6}$	246,9	95,6
$3,45 \times 10^{-5}$	192,8	74,6
$6,9 \times 10^{-5}$	50,3	19,5
$3,45 \times 10^{-4}$	40,9	15,8
$6,9 \times 10^{-4}$	40,8	15,8

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

4. Böckler, Hans, 24 J.

Aktivität 246,3

$6,9 \times 10^{-8}$	244,5	99,3
$3,45 \times 10^{-7}$	244,5	99,3
$6,9 \times 10^{-7}$	244,5	99,3
$3,45 \times 10^{-6}$	245,2	99,6
$6,9 \times 10^{-6}$	244,9	99,4
$3,45 \times 10^{-5}$	153,4	62,3
$6,9 \times 10^{-5}$	53,2	21,6
$3,45 \times 10^{-4}$	44,3	18,0
$6,9 \times 10^{-4}$	44,3	18,0

EDTA-Konzentration im Meßansatz		Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
Mol/l	U/l	

5. Geldmacher, Jan, 33 J.

Aktivität 240,3

$6,9 \times 10^{-8}$	237,0	98,6
$3,45 \times 10^{-7}$	224,3	93,3
$6,9 \times 10^{-7}$	220,4	91,7
$3,45 \times 10^{-6}$	232,4	96,7
$6,9 \times 10^{-6}$	227,1	94,5
$3,45 \times 10^{-5}$	144,9	60,3
$6,9 \times 10^{-5}$	38,3	15,9
$3,45 \times 10^{-4}$	31,9	13,3
$6,9 \times 10^{-4}$	28,7	11,7

c) hoher Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz		Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
Mol/l	U/l	

1. Faber, Renate, 27 J.

Aktivität 544,9

$6,9 \times 10^{-8}$	529,0	101,3
$3,45 \times 10^{-7}$	526,6	96,6
$6,9 \times 10^{-7}$	568,7	104,4
$3,45 \times 10^{-6}$	552,0	101,3
$6,9 \times 10^{-6}$	520,2	95,5
$3,45 \times 10^{-5}$	391,5	71,8
$6,9 \times 10^{-5}$	57,7	10,6
$3,45 \times 10^{-4}$	51,4	9,4
$6,9 \times 10^{-4}$	48,5	8,9

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

2. Burger, Brigitte, 24 J.

Aktivität 521,7

$6,9 \times 10^{-8}$	485,4	93,0
$3,45 \times 10^{-7}$	467,4	89,6
$6,9 \times 10^{-7}$	510,0	97,8
$3,45 \times 10^{-6}$	490,2	94,0
$6,9 \times 10^{-6}$	482,2	92,4
$3,45 \times 10^{-5}$	303,0	58,1
$6,9 \times 10^{-5}$	50,3	9,6
$3,45 \times 10^{-4}$	42,5	8,1
$6,9 \times 10^{-4}$	41,5	8,0

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

3. Dietrich, Hans-Georg, 29 J.

Aktivität 517,3

$6,9 \times 10^{-8}$	502,1	97,1
$3,45 \times 10^{-7}$	496,1	95,9
$6,9 \times 10^{-7}$	512,0	99,0
$3,45 \times 10^{-6}$	495,7	95,8
$6,9 \times 10^{-6}$	484,4	93,6
$3,45 \times 10^{-5}$	315,7	61,0
$6,9 \times 10^{-5}$	36,9	7,1
$3,45 \times 10^{-4}$	33,0	6,4
$6,9 \times 10^{-4}$	31,2	6,0

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

4. Geldmacher, Herbert, 62 J.

Aktivität 428,7

$6,9 \times 10^{-8}$	413,9	96,5
$3,45 \times 10^{-7}$	410,3	95,7
$6,9 \times 10^{-7}$	434,4	101,3
$3,45 \times 10^{-6}$	404,0	94,2
$6,9 \times 10^{-6}$	394,0	91,9
$3,45 \times 10^{-5}$	318,9	74,4
$6,9 \times 10^{-5}$	30,1	7,0
$3,45 \times 10^{-4}$	23,7	5,5
$6,9 \times 10^{-4}$	23,7	5,5

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	U/l	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität
---	-----	---

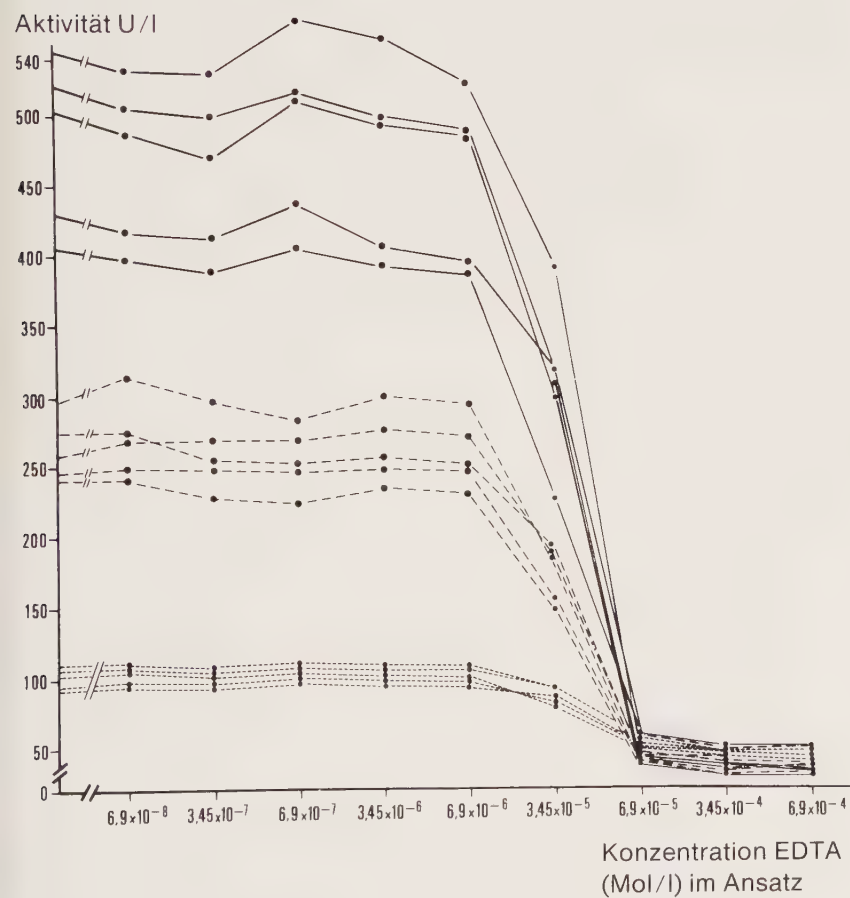
5. Dietrich, Henriette, 57 J.

Aktivität 405,4

$6,9 \times 10^{-8}$	395,1	97,5
$3,45 \times 10^{-7}$	386,2	95,3
$6,9 \times 10^{-7}$	403,2	99,5
$3,45 \times 10^{-6}$	390,5	96,3
$6,9 \times 10^{-6}$	385,2	95,0
$3,45 \times 10^{-5}$	221,5	54,6
$6,9 \times 10^{-5}$	48,6	12,0
$3,45 \times 10^{-4}$	37,6	9,3
$6,9 \times 10^{-4}$	34,0	8,4

Die Ergebnisse sind in Abb. 5 graphisch dargestellt.

Darstellung der Paraoxonaseaktivität bei steigendem EDTA Zusatz zum Meßansatz



4. VERSUCH EINER AUFHEBUNG DER EDTA-HEMMUNG DURCH Ca^{2+} -ZUSATZ

Es wurde nun versucht bei je einem Serum der drei Aktivitätsgruppen nach der Zugabe von EDTA das gehemmte Enzym durch nachfolgende Zugabe von Ca^{2+} wieder zu aktivieren. Dies war jedoch nur in geringem Maße möglich.

Die EDTA-Konzentration im Meßansatz betrug $5,4 \times 10^{-4}$ Mol/l, das entspricht dem Wert, mit dem die höchste Enzymaktivitätshemmung gemessen werden konnte. Nun wurde mit steigender Ca^{2+} -Konzentration versucht, diese Hemmung wieder reversibel zu machen.

Als Ca^{2+} -Konzentrationen wurden die in Tabelle 6 wiedergegebenen Konzentrationen gewählt. Die genannte Ca^{2+} -Menge wurde in den Glycin-NaOH-Puffer gelöst.

Tabelle 6:

Nach der Hemmung durch EDTA zugefügte Ca^{2+} -Konzentrationen in Mol/l im Meßansatz

$1,1 \times 10^{-4}$ Mol/l

$5,7 \times 10^{-4}$ Mol/l

$1,1 \times 10^{-3}$ Mol/l

$5,7 \times 10^{-3}$ Mol/l

$1,1 \times 10^{-2}$ Mol/l

Die Komponenten des Meßansatzes wurden in folgender Weise zusammengegeben:

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer mit einer EDTA-Konzentration von $5,4 \times 10^{-4}$ Mol/l

drei Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubieren

0,5 ml Serumverdünnung

drei Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubieren

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer mit Ca^{2+} , entsprechend Tabelle 6

1,0 ml E 600 Gebrauchslösung

Die Messung und Berechnung erfolgte wie bei III/1 e-f beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7:

Ergebnisse des Versuchs einer Aufhebung der EDTA-Hemmung durch nachträglichen Ca^{2+} -Zusatz beim 1. niedrigen, 2. mittleren und 3. hohen Typ

EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	Ca^{2+} -Konzentration im Meßansatz Mol/l	Enzymaktivität U/l
1. Merklein, Bernhard		Aktivität 98,9
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	43,6
$5,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-4}$	56,4
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	61,7
$5,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-3}$	63,3
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$	72,3
2. Hechtel, Renate		Aktivität 260,4
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	37,9
$5,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-4}$	73,0
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	71,9
$5,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-3}$	67,3
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$	75,1
3. Geldmacher, Herbert		Aktivität 410,9
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	30,3
$5,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-4}$	78,7
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	93,5
$5,4 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-3}$	79,7
$5,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$	67,5

5. VERSUCH EINES SCHUTZES DES ENZYMS VOR DER EDTA-HEMMUNG DURCH Ca^{2+} -ZUSATZ

Ein Schutz der Enzymaktivität gegen die EDTA-Hemmung war möglich, wenn man zuerst in den Ansatz Ca^{2+} pipettierte und danach erst EDTA zusetzte, und zwar war der Schutz umso wirkungsvoller, je mehr Ca^{2+} verwendet wurde.

Es wurde mit denselben Konzentrationen wie unter III/4 gearbeitet, jedoch die Komponenten des Meßansatzes dieses Mal wie folgt zusammengegeben:

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer mit Ca^{2+} , entsprechend Tabelle 6
drei Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubieren

0,5 ml Serumverdünnung

drei Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubieren

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer mit einer EDTA-Konzentration von
 $5,4 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$

1,0 ml E 600 Gebrauchslösung

Die Messung und Berechnung erfolgte ebenso wie unter III/1 e-f.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8:

Ergebnisse des Versuchs eines Schutzes des Enzyms vor der EDTA-Hemmung durch vorherigen Ca^{2+} -Zusatz beim 1. niedrigen, 2. mittleren und 3. hohen Typ

Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Meßansatz Mol/l	EDTA-Konzentration im Meßansatz Mol/l	Enzymaktivität U/l
1. Merklein, Bernhard		Aktivität 98,9
$1,1 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$	42,0
$5,7 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$	101,5
$1,1 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-4}$	118,6
$5,7 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-4}$	121,7
$1,1 \times 10^{-2}$	$5,4 \times 10^{-4}$	170,1
2. Hechtel, Renate		Aktivität 260,4
$1,1 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$	41,5
$5,7 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$	253,6
$1,1 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-4}$	295,0
$5,7 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-4}$	200,9
$1,1 \times 10^{-2}$	$5,4 \times 10^{-4}$	256,7
3. Geldmacher, Herbert		Aktivität 410,9
$1,1 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$	41,0
$5,7 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$	457,6
$1,1 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-4}$	466,1
$5,7 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-4}$	266,3
$1,1 \times 10^{-2}$	$5,4 \times 10^{-4}$	395,5

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, hat man nun versucht durch nachträgliche Zugabe von Ca^{2+} das gehemmte Enzym wieder zu aktivieren. Es ist nicht gelungen die Ausgangsaktivität wieder zu erreichen, jedoch ließ sich eine geringfügige Aktivitätssteigerung feststellen.

Bei vorherigem Zusatz von Ca^{2+} zum Ansatz läßt sich aus Tabelle 8 erkennen, daß bei allen drei Paraoxonasetypen bei Zusatz einer Konzentration von $5,4 \times 10^{-4}$ Mol/l EDTA zu einer Konzentration von $5,7 \times 10^{-4}$ Mol/l Ca^{2+} die Ausgangsaktivität wieder erreicht wird. Man kann also sagen, daß dieses vorher zugesetzte Ca^{2+} einen Schutz gegen die Hemmung des Enzyms im gleichen molaren Verhältnis 1:1, wie auf Seite 12 dargestellt, durch EDTA ausübt. Ferner wurde bestätigt, daß sobald mit molaren Verhältnissen gearbeitet wird, die Ausgangsaktivität wieder erreicht wird. Bei weiterer Zugabe von Ca^{2+} zeigte sich sogar ein typenspezifisches Verhalten, wie schon **Hartl** (1978) feststellte: der niedrige Typ ist durch weitere Zugabe von Ca^{2+} weiterhin zu aktivieren. Der mittlere Typ zeigt eine geringe Aktivitätszunahme, um dann langsam wieder abzufallen. Die Aktivität des hohen Typs war durch weitere Zugabe von Ca^{2+} überhaupt nicht zu steigern. Durch weiteren Zusatz von Ca^{2+} wurde die Paraoxonaseaktivität nur kontinuierlich gehemmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die menschliche Serumparaoxonase durch EDTA gehemmt werden kann. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, stellte bereits **Krisch** (1968) eine Hemmbarkeit der Aktivität bei einer Konzentration von 10^{-3} M EDTA um 45%, bei einer Konzentration von 10^{-4} M EDTA um 53% fest. Er machte aber keine Aussage über die Ausgangsaktivität.

Entsprechend der Zuordnung der Seren nach **Geldmacher-v. Malinckrodt** und **Mitarbeiter** (1973a) in einen niedrigen, mittleren und hohen Typ, konnte ich folgendes feststellen:

Bei der niedrigen Paraoxonaseaktivität ist bei Zugabe von EDTA ein flacher Verlauf der Kurve bis zu einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-6}$ Mol/l EDTA im Meßansatz zu erkennen. Danach zeigt sich ein steiler Abfall, der bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-5}$ Mol/l EDTA im Meßansatz zu 47,8 – 54,3% der Ausgangsaktivität führt. Bei weiterer Zugabe von EDTA weicht die Paraoxonaseaktivität kaum noch von diesen Werten ab. Es bleibt eine Restaktivität von etwa 37,6 – 46,8 U/l.

Bei der mittleren Aktivitätsgruppe ergibt sich bei Zugabe von EDTA zunächst eine geringe Minderung der Aktivität. Die Aktivität steigt dann wieder etwas an. Bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-6}$ Mol/l EDTA im Meßansatz stellt sich ebenfalls ein deutlicher Abfall der Aktivität ein, der bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-5}$ Mol/l EDTA im Meßansatz zu einem Absinken der Ausgangsaktivität auf 14,7 – 21,6% führt. Bei weiterer Zugabe von EDTA weicht die Paraoxonaseaktivität kaum noch von diesen Werten ab. Die Endaktivität liegt etwa bei 28,7 – 44,3 U/l.

Bei der hohen Paraoxonaseaktivitätsgruppe zeigt sich bei der Zugabe von EDTA zuerst eine geringe Minderung der Aktivität. Darauf folgt eine geringe Aktivierung und ebenso bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-6}$ Mol/l EDTA im Meßansatz ein deutlicher Abfall bis auf 7,1 – 12,0% der Ausgangsaktivität bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-5}$ Mol/l EDTA im Meßansatz. Bei weiterer Zugabe von EDTA weicht die Paraoxonaseaktivität kaum noch von diesen Werten ab, die etwa bei 23,7 – 48,5 U/l liegen.

Erhöht man die EDTA-Konzentration weiter, so bleibt die Restaktivität für alle drei Typen praktisch gleich. Diese Restaktivität ist vielleicht gegeben durch die andere Paraoxonase spaltende Enzymfraktion, die nicht mit EDTA hemmbar ist. Schon **Aldrige** (1953a) teilte die Serumesterasen von Kaninchen, Pferd und Ratte nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in eine A-Esterase und B-Esterase ein. Jene Esterase, welche durch E 600 nicht aktiviert wurde, nannte er A-Esterase (Aryl- oder Aromatic-Esterase). 1961 fanden auch **Erdös** und **Boggs**, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. 1968 konnten auch **Skrinjaric-Spoljar** und **Mitarbeiter** diese Vermutung früherer Arbeiten bestätigen. Es zeigten sich nämlich zwei Enzymanteile, einer, der durch EDTA hemmbar ist und ein anderer, der durch Aurintricarbonsäure völlig auszuschalten ist, jedoch durch EDTA nicht gehemmt wird.

Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchung kann festgehalten werden, daß EDTA bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-5}$ Mol/l im Meßansatz, das entspricht einer EDTA-Ausgangskonzentration von 1×10^{-4} M, die Aktivität der Serumparaoxonase aller drei Typen hemmt. Auch **Krisch** (1968) beobachtete bei einer Konzentration von 10^{-4} M EDTA einen Abfall der Aktivität auf 53%, wobei er nur den niedrigen Typ bestimmt haben dürfte. **Krisch** (1968) stellte ferner bei einer Konzentration von 10^{-3} M EDTA eine Hemmung von 45% fest. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, dürfte **Krisch** auch hier den niedrigen Typ bestimmt haben.

Berücksichtigt man, daß in unseren Versuchen pro Typ nur fünf Seren untersucht wurden, so läßt sich doch ein gleichartiges Verhalten darstellen, wenn man die Prozentzahlen der Ausgangsaktivität pro Konzentration der hohen, mittleren und niedrigen Aktivitätsgruppen in Zusammenhang mit der jeweiligen EDTA-Konzentration miteinander vergleicht.

Ein typenspezifisches Verhalten, das auch geprüft wurde, ist nur in geringem Maße bei niedrigen EDTA-Konzentrationen zu erkennen.

So zeigte sich jeweils ein geringer Aktivitätsanstieg, der bei der niedrigen Paraoxonaseaktivität bei $6,9 \times 10^{-7}$ Mol/l EDTA im Meßansatz lag, bei der mittleren Paraoxonaseaktivität bei einer Konzentration von $3,45 \times 10^{-6}$ Mol/l EDTA im Meßansatz und bei der hohen Paraoxonaseaktivität bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-7}$ Mol/l EDTA im Meßansatz.

Ein typenspezifisches Verhalten der Aktivitäten der drei Gruppen bei Zusatz von hohen Konzentrationen ist allerdings nicht zu erkennen.

Völlig identisch ist der Beginn des Aktivitätsabfalls bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-6}$ Mol/l EDTA im Meßansatz, um dann bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-5}$ Mol/l EDTA im Meßansatz das Maximum des Aktivitätsverlustes zu erreichen. Die Restaktivität liegt immer bei $23,7 - 48,5$ U/l.

Die erhaltenen Ergebnisse haben praktische Bedeutung: eine Verhinderung der spontanen Gerinnung des Blutes wird durch Zusatz von Antikoagulantien, wie Oxalat, Citrat, Fluorid, Titriplex III (= EDTA) oder Heparin, erreicht. Es ist wichtig, den Einfluß verschiedener EDTA-Konzentrationen auf die Paraoxonaseaktivität zu kennen, da bei der Blutentnahme ein EDTA-Zusatz, der die Koagulation verhindern soll, erfolgen kann. In einem solchen Fall müßten falsche niedrige Werte für die Paraoxonase gemessen werden. Die gerinnungshemmende Konzentration pro ml Blut beträgt für EDTA 1 mg, bzw. 0,01 ml einer 10%-igen Titriplex III-Lösung. Das würde zu einer EDTA-Konzentration im Meßansatz von $5,2 \times 10^{-3}$ M führen.

Bedeutung haben die gefundenen Ergebnisse ferner bei der quantitativen Bestimmung von Paraoxon im Serum, wie sie bei der Kontrolle des Erfolgs beim Einsatz der „künstlichen Leber“ bei einer E 600-Vergiftung erfolgt (Hämoperfusion).

Okonek (1977) konnte bei seinen Hämoperfusionsversuchen zeigen, daß im Serum immer wesentlich mehr Paraoxon als Parathion vorliegt, wie aus Abb. 6a,b ersichtlich.

Abbildung 6a

Verlauf der Nitrostigminkonzentration im Plasma eines Patienten jeweils vor und nach der Hämo-perfusionssäule (● vor der Hämo-perfusionssäule, O nach der Hämo-perfusionssäule)

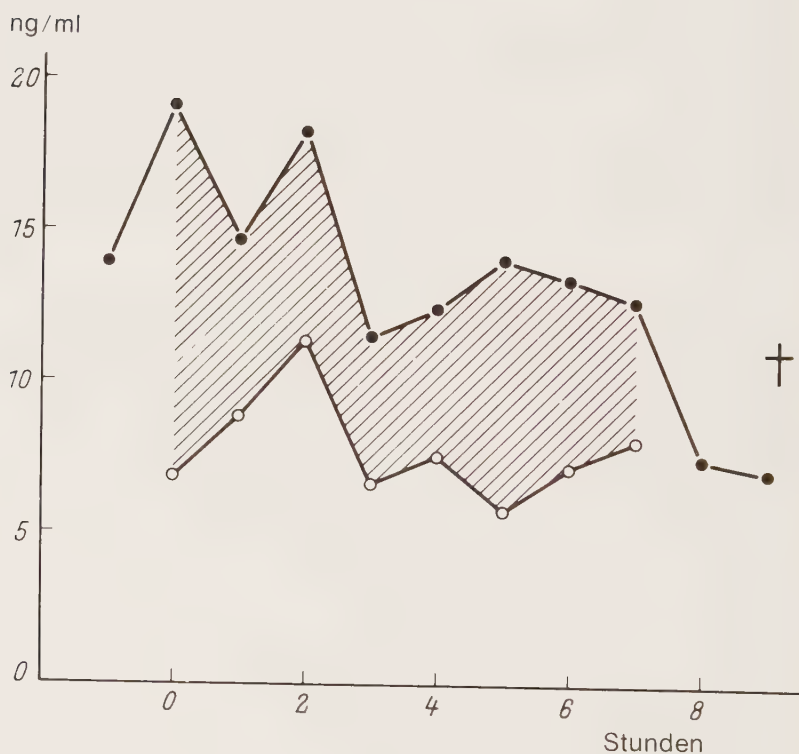
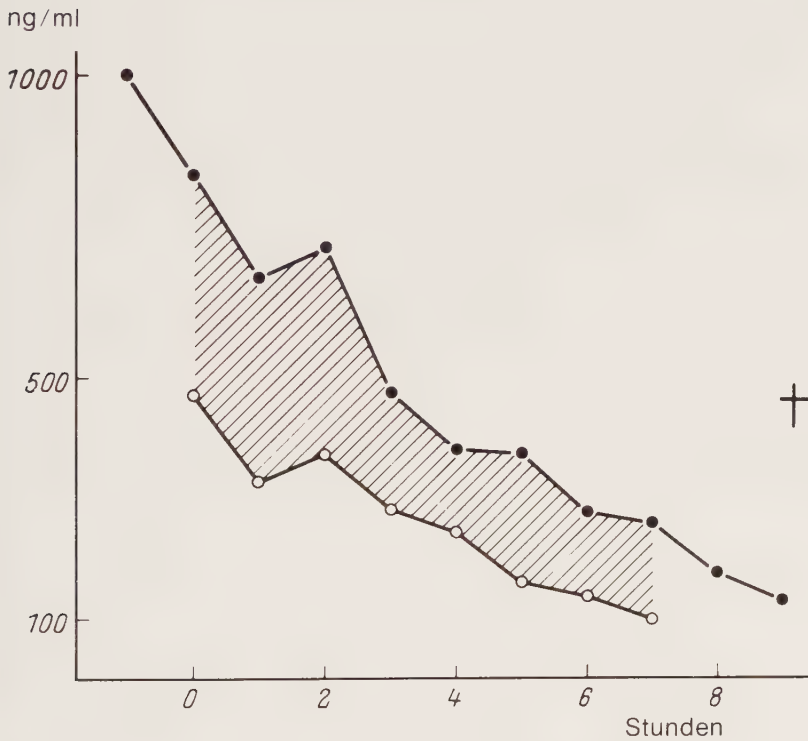


Abbildung 6b

Verlauf der Paraoxonkonzentration im Plasma eines Patienten jeweils vor und nach der Hämo-perfusionssäule (● vor der Hämo-perfusions-säule, O nach der Hämo-perfusions-säule)



Diese beiden Abbildungen zeigen den Verlauf der suicidalen E 605-Vergiftung eines 25-jährigen Mannes. In der ersten Abbildung wird durch Hämo-perfusion mit einer mittleren Clearance von 72,88 ml/Min. der Nitrostigminspiegel auf etwa 50% der Ausgangswerte gesenkt. In der zweiten Abbildung wird der Verlauf des Paraoxonspiegels dargestellt, da das toxische Agens bei einer E 605-Vergiftung der Metabolit Paraoxon ist, der aus Nitrostigmin gebildet wird. Der mittlere Paraoxonclearance-Wert betrug 76,18 ml/Min., die Paraoxonkonzentration fiel rascher ab als die Nitrostigminkonzentration.

Es ist deshalb sehr wichtig, bei solchen Bestimmungen daran zu denken, daß bei Vorliegen einer hohen Paraoxonaseaktivität im entnommenen Blut der Paraoxongehalt sehr rasch abnehmen kann, so daß dann bei der Bestimmung falsche Werte erhalten werden. Ein sofortiger Zusatz von EDTA, in der zur Verhinderung einer Koagulation üblichen Menge, hemmt die Paraoxonase völlig, so daß auch bei nicht sofort erfolgender Paraoxonbestimmung richtige Werte erhalten werden.

Alle drei Aktivitätstypen der Serumparaoxonase sind durch EDTA in entsprechenden Konzentrationen hemmbar. Es ließ sich bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-6}$ Mol/l EDTA im Meßansatz nach **Krisch** (1968) ein schlagartiger Abfall der Aktivität der Serumparaoxonase zeigen, der bei einer Konzentration von $6,9 \times 10^{-5}$ Mol/l EDTA zu einer Restaktivität von 23,7 – 48,5 U/l führt.

Es ist somit wichtig, bei der Blutabnahme zur Paraoxonaseaktivitätsbestimmung kein EDTA, in der zur Verhinderung einer Koagulation üblichen Menge, zuzusetzen. Dagegen ist ein EDTA-Zusatz bei der Paraoxonbestimmung im Blut bei nicht sofortiger Aufbereitung von Bedeutung, da durch Zugabe von EDTA zur Probe die Paraoxonase gehemmt wird und somit keine zu niedrigen, falschen Werte für Paraoxon gemessen werden.

Das durch EDTA gehemmte Enzym durch sofortige Zugabe von Ca^{2+} wieder zu aktivieren war nicht möglich. Dagegen übte vorheriger Zusatz von Ca^{2+} eine Schutzfunktion gegenüber EDTA aus, wobei molare Verhältnisse gefunden wurden.

Mit Hilfe von EDTA als Hemmstoff ist keine Differenzierung der drei Paraoxonasetypen zu erreichen.

Aldrige, W. N.:

Serum esterases. An enzyme hydrolysing p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* **53**, 117 (1953)

Choi, S. S. and T. L. Forster:

Triton X-155 as a stabilizer of bovine plasma arylesterase activity. *J. Dairy Sci.* **50**, 837 (1967a)

Dumbach, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (EC 3.1.1.2.).
Dissertation Erlangen 1976

Enzyme Nomenclature:

Recommendations (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry.
Elsevier, Amsterdam (1973)

Erdös, E. G. and L. E. Boggs:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature **190**, 716 (1961)

Erdös, E. G., C. R. Debay and M. P. Westermann:

Activation and inhibition of the arylesterase of human serum.
Nature **184**, 430 (1959)

Erdös, E. G., C. R. Debay and M. P. Westermann:

Arylesterases in blood: Effect of calcium and inhibitors.
Biochem. Pharmacol. **5**, 173 (1960)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Rabast, U., Lindorf, H. H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterase mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).
Arch. Toxikol. **25**, 223 (1969a)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Urbach, H. J., Kittel, H., Lindorf, H. H.:

Zur Messung der in vivo- und in vitro-Reaktivierbarkeit alkylphosphat-vergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM und Toxogonin mit verschiedenen Substraten.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **7**, 480 (1969b)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H. H., Petenyi, M., Flügel, M., Fischer, Th., Hiller, Th.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.).

Humangenetik **17**, 331 (1973a)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Petenyi, M., Metzner, H., Burgis, H., Dietzel, B., Nirschl, H., Renner, O.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Z. Physiol. Chem. **354**, 337 (1973b)

Hartl, W.:

Untersuchungen über den Einfluß steigender Ca^{2+} Konzentrationen im menschlichen Serum auf die Aktivität der Serum-Paraoxonase.

Dissertation Erlangen in Vorbereitung

Jander, G., Blasius, E.:

Einführung in das organisch chemische Praktikum.

Verlag S. Hirzel, Stuttgart (1973)

Jarczyk, H. J.:

Der Einfluß von Esterasen in Insekten auf den Abbau von Phosphorsäureestern der E 605 Reihe.

Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer **19**, 1 (1966)

Krisch, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **6**, 41 (1968)

Marton, A. V. and W. Kalow:

Inhibitors of aromatic esterase of human serum.
Biochem. Pharmacol. **3**, 149 (1960)

Menzel, W.:

Die Serumarylesterasen (EC 3.1.1.2.) in der Literatur von 1942 – 1971.
Dissertation Erlangen 1978

Neal, R. A.:

Enzymic mechanism of metabolism of the phosphorothioate insecticides.
Arch. Intern. Med. **128**, 118 (1971)

Okonek, S.:

Hämoperfusion zur Behandlung akuter Intoxikationen durch Pflanzenschutzmittel.
Med. Klin. **72**, 862 (1977)

Poore, R. E., Neal, R. A.:

Evidence for extrahepatic metabolism of parathion.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **23**, 759 (1972)

Skrinjaric-Spoljar, M. and E. Reiner:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphate by human sera.
Biochem. Biophys. Acta **165**, 289 (1968)

Wellhöner, H.:

Pharmakologie und Toxikologie.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1975)

DANKSAGUNG

Besonders herzlich danke ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, ihrer großen Hilfsbereitschaft und die zu jeder Zeit so freundlich erteilten Ratschläge.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt auch Herrn Opitz für die große Hilfe bei der Anfertigung der graphischen Darstellungen.

LEBENS LAUF

05. 09. 1951 in Selb als Tochter des Zeitungsverlegers Richard Hechtel und seiner Ehefrau Ruth, geb. Krautheim, geboren.
- 1958 – 1962 Besuch der Volksschule in Selb.
- 1962 – 1971 Besuch des Gymnasiums mit dem Abschluß des Abiturs an der Max-Rill-Schule in Reichersbeuern.
01. 04. 1972 – 31. 03. 1974 Ausbildung als Medizinisch-technische Assistentin an der Staatlichen Lehranstalt für Medizinisch-technische Assistentinnen in Erlangen.
01. 04. 1974 – 30. 09. 1974 Anerkennungspraktikum als Medizinisch-technische Assistentin an der Universitäts-Kinderklinik Erlangen.
01. 11. 1974 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
27. 08. 1976 Ärztliche Vorprüfung.
26. 08. 1977 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
21. 08. 1979 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
05. 11. 1980 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Herstellung: Druckhaus Münch GmbH, Selb

